

同步荧光法结合化学计量学方法分析血样中卟啉

黄维

指导老师 李耀群教授

厦门大学

学校编码: 10384  
学号: 20520061151912

分类号\_\_密级\_\_  
UDC\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

同步荧光技术结合化学计量学方法分析血  
样中卟啉

Synchronous fluorescence technique combined with  
chemometrics methods for the determination of porphyrins  
in blood

黄 维

指导教师姓名: 李耀群 教授  
专 业 名 称: 分 析 化 学  
论文提交日期: 2009 年 6 月  
论文答辩时间: 2009 年 月  
学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_  
评阅人: \_\_\_\_\_

2009 年 月

**SYNCHRONOUS FLUORESCENCE TECHNIQUE  
COMBINED WITH CHEMOMETRICS METHODS FOR  
THE DETERMINATION OF PORPHYRINS IN BLOOD**

A Dissertation Presented

By

Wei Huang

Supervisor: Prof. Yao-Qun Li

Submitted to the Graduate School of Xiamen University for the

Degree of

**Master of Science**

Department of Chemistry, Xiamen University

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

---

厦门大学博硕士论文摘要库

# 目录

摘 要.....	I
Abstract .....	III
<b>第一章 文献综述 .....</b>	<b>1</b>
第一节 卟啉及生物标志物.....	1
1.1.1 卟啉及卟啉症简介 .....	1
1.1.2 卟啉的检测方法 .....	6
1.1.2.1 分光光度法 .....	6
1.1.2.2 荧光法 .....	6
1.1.2.3 高效液相色谱法 .....	7
第二节 同步荧光方法.....	8
1.2.1 同步荧光方法概述 .....	8
1.2.2 可变角同步荧光法 .....	8
1.2.3 恒基体同步荧光法 .....	10
第三节 化学计量学方法与荧光技术的联用.....	13
1.3.1 化学计量学方法 .....	13
1.3.2 化学计量学方法与荧光法的联用 .....	15
第四节 论文设想.....	17
参考文献.....	19
<b>第二章 两种荧光方法分析全血中锌原卟啉和原卟啉 .....</b>	<b>33</b>
第一节 针对全血卟啉荧光分析的溶剂考察.....	33
2.1.1 引言 .....	33
2.1.2 实验部分 .....	33
2.1.2.1 仪器与试剂 .....	33



2.1.2.2 溶液配制 .....	34
2.1.3 结果与讨论 .....	34
2.1.3.1 溶剂极性的影响 .....	34
2.1.3.2 离子强度的影响 .....	35
2.1.3.3 稳定性的考察 .....	35
2.1.3.4 从全血中萃取卟啉的可行性考察 .....	36
<b>第二节 两种荧光方法分析全血中锌原卟啉和原卟啉 .....</b>	<b>39</b>
2.2.1 引言 .....	39
2.2.2 实验部分 .....	39
2.2.2.1 实验仪器和试剂 .....	39
2.2.2.2 实验方法 .....	40
2.2.3 结果与讨论 .....	40
2.2.3.1 三维荧光—交替三线性分解算法同时测定锌原卟啉和原卟啉 .....	40
2.2.3.2 导数恒基体同步荧光法同时测定锌原卟啉和原卟啉 .....	42
2.2.3.3 全血提取液中锌原卟啉和原卟啉的测定以及两种方法的对比 .....	44
2.3 小结 .....	46
参考文献 .....	47
 <b>第三章 非线性可变角同步荧光技术结合偏最小二乘法同时快速分</b>	
<b>析全血中原卟啉、尿卟啉和粪卟啉 .....</b>	<b>50</b>
3.1 前言 .....	50
3.2 实验部分 .....	51
3.2.1 仪器 .....	51
3.2.2 试剂 .....	51
3.2.3 样品处理 .....	52
3.3 结果与讨论 .....	52
3.3.1 激发、发射荧光光谱 .....	52
3.3.2 非线性可变角同步荧光法扫描路径的选择 .....	53

3.3.3 标准样品的非线性可变角同步荧光光谱 .....	54
3.3.4 偏最小二乘法模型 .....	55
3.3.5 实际全血样的分析 .....	59
3.4 小结 .....	60
参考文献 .....	61
<b>第四章 导数恒基体—非线性可变角同步荧光法同时测定超微量血</b>	
<b>细胞中原卟啉、粪卟啉和锌原卟啉 .....</b>	<b>64</b>
4.1 引言 .....	64
4.2 实验部分 .....	65
4.2.1 实验仪器 .....	65
4.2.2 实验方法 .....	65
4.3 结果与讨论 .....	66
4.3.1 最佳恒基体—非线性可变角同步荧光扫描路径的选择 .....	67
4.3.2 标准溶液的导数恒基体—非线性可变角同步荧光光谱 .....	68
4.3.3 实际样品 .....	70
4.4 小结 .....	72
参考文献 .....	74
<b>总结与展望 .....</b>	<b>77</b>
<b>缩略语 .....</b>	<b>79</b>
<b>在学期间论文发表情况 .....</b>	<b>80</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>81</b>

# CATALOG

<b>Abstract(Chinese)</b> .....	<b>I</b>
--------------------------------	----------

<b>Abstract(English)</b> .....	<b>III</b>
--------------------------------	------------

<b>Chapter 1 Preface</b> .....	<b>1</b>
--------------------------------	----------

<b>1.1 Porphyrin and Biomarker</b> .....	<b>1</b>
--	----------

1.1.1 Introduction of Porphyrin and Porphyria.....	1
--	---

1.1.2 Determination Methods of Porphyrin .....	6
--	---

1.1.2.1 Spectrophotometry.....	6
--------------------------------	---

1.1.2.2 Spectrofluorimetry.....	6
---------------------------------	---

1.1.2.3 High Performance Liquid Chromatography.....	7
---	---

<b>1.2 Synchronous Fluorescence Spectrometry</b> .....	<b>8</b>
--	----------

1.2.1 Sketch of Synchronous Fluorescence Spectrometry .....	8
---	---

1.2.2 Variable Angle Synchronous Fluorescence Spectrometry .....	8
--	---

1.2.3 Matrix Isopotential Synchronous Fluorescence Spectrometry .....	10
---	----

<b>1.3 Coupling Technique of Chemometrics Methods and Spectrofluorimetry</b> ....	<b>13</b>
---	-----------

1.3.1 Chemometrics Methods .....	13
----------------------------------	----

1.3.2 Chemometrics Methods Combined with Spectrofluorimetry .....	15
---	----

<b>1.4 Plans of Dissertation</b> .....	<b>17</b>
--	-----------

<b>References</b> .....	<b>19</b>
-------------------------	-----------

## Chapter 2 Analysis of Zinc ProtoporphyrinIX and

## ProtoporphyrinIX in Whole Blood by Two Fluorimetric Methods.....33

<b>2.1 Investigation on Solvent for Fluorescence Analysis of Porphyrin in Whole Blood</b> .....	<b>33</b>
---	-----------

2.1.1 Introduction .....	33
--------------------------	----

2.1.2 Experimental .....	33
2.1.2.1 Apparatus and Chemicals .....	33
2.1.2.2 Preparation of Solution.....	34
2.1.3 Results and Discussion.....	34
2.1.3.1 Effect of Solvent Polarity .....	34
2.1.3.2 Effect of Ionic Strength .....	35
2.1.3.3 Investigation of Stability.....	35
2.1.3.4 Investigation on Feasibility of Porphyrin Extraction in Whole Blood...	36
<b>2.2 Analysis of Zinc ProtoporphyrinIX and ProtoporphyrinIX in Whole Blood by Two Fluorimetric Methods.....</b>	<b>39</b>
2.2.1 Introduction .....	39
2.2.2 Experimental .....	39
2.2.2.1 Apparatus and Chemicals .....	39
2.2.2.2 Experimental Method .....	40
2.2.3 Results and Discussion.....	40
2.2.3.1 Simultaneous Determination of Zinc PorphyrinIX and ProporphyrinIX in Whole Blood by EEM-ATLD Algorithm .....	40
2.2.3.2 Simultaneous Determination of Zinc PorphyrinIX and ProporphyrinIX by Derivative Matrix Isopotential Synchronous Fluorescence Spectrometry ....	42
2.2.3.3 Determination of Porphyrins in Whole Blood Samples and Method Comparison .....	44
<b>2.3 Conclusion.....</b>	<b>46</b>
<b>References.....</b>	<b>47</b>

<b>Chapter 3 Rapidly Simultaneous Determination of PorphyrinIX、UroporphyrinIX and CoproporphyrinIII in Whole Blood by Non-linear Variable Angle Synchronous Technique Combined with Partial Least Squares.....</b>	<b>50</b>
--	-----------

<b>3.1 Introduction</b> .....	50
<b>3.2 Experimental</b> .....	51
3.2.1 Apparatus .....	51
3.2.2 Chemicals.....	51
3.2.3 Sample Preparation .....	52
<b>3.3 Result and Discussion</b> .....	52
3.3.1 Excitation and Emission Fluorescence Spectra .....	52
3.3.2 Selection of Non-linear Variable Angle Synchronous Scanning Path.....	53
3.3.3 Non-linear Variable Angle Synchronous Spectrum of Standard Samples.....	54
3.3.4 Modle of Partial Least Squares.....	55
3.3.5 Analysis of Whole Blood Sample .....	59
<b>3.4 Conclusion</b> .....	60
<b>References</b> .....	61
 <b>Charpter 4 Simultaneous Ditermination of ProtoporphyrinIX、 CoproporphyrinIII and Zinc PrototporphyrinIX in Ultromicro Blood Cells by Derivative Matrix Isopotential—Non-linear Variable Angle Synchronous Fluorescence Spectrometry</b> .....	
<b>4.1 Introduction</b> .....	64
<b>4.2 Experimental</b> .....	65
4.2.1 Apparatus .....	65
4.2.2 Exiperental Method.....	65
<b>4.3 Result and discussion</b> .....	66
4.3.1 Selection of Matrix Isopotential—Non-linear Variable Angle Synchronous Fluorescence Spectrometry.....	67
4.3.2 Derivative Matrix Isopotential—Non-linear Variable Angle Synchronous Fluorescence Spectrum of Standard Solution .....	68

4.3.4 Analysis of Blood Cells .....	70
<b>4.4 Conclusion</b> .....	72
<b>References</b> .....	74
<b>Summary and Prospect</b> .....	77
<b>Appendix I</b> .....	79
<b>Appendix II</b> .....	80
<b>Acknowledgement</b> .....	81

厦门大学博士论文摘要库

## 摘 要

同步荧光技术具有简化谱图、减少光散射、提高选择性等优势,适合于多组分混合物的分析。该技术近几年与具有较好“数学分离”功能的化学计量学方法相结合,能更好地以“光谱分辨”结合“数学分离”克服多组分体系中光谱严重重叠这一难题,从而在复杂体系的解析中得到越来越广泛应用。本论文致力于发展简便快速,并能同时测定血液中多种卟啉的同步荧光分析方法,通过结合导数技术消除基体干扰或化学计量学方法来解决多重共线问题。论文分为四章:

第一章是文献综述。首先介绍卟啉作为生物标志物的应用价值以及卟啉的分析方法;然后阐述了同步荧光法的理论基础、发展和应用以及同步荧光技术结合化学计量学方法研究进展;最后提出了本论文的研究设想。

第二章综合考察荧光强度,稳定性及萃取全血中卟啉的可行性等影响因素,得出 N,N-二甲基甲酰胺是一种非常稳定的且能用于测定全血中卟啉的新型溶剂的结论。利用该溶剂萃取全血中的卟啉,建立了同时测定全血中痕量锌原卟啉和原卟啉的三维荧光—交替三线形分解算法和导数恒基体同步荧光法,并考察了两种方法的检测限、精密度和加标回收率。实际全血中两种方法的平均回收率:前者为 $(82\pm 9)\%$ ,后者为 $(85\pm 10)\%$ ,且两种方法测定 20 份全血样时获得的相关性良好。

第三章提出了非线性可变角同步荧光技术结合偏最小二乘法来同时分析全血中的原卟啉、尿卟啉和粪卟啉。该法一次光谱扫描只需 30s,简便快速。三种卟啉的检测限依次为:0.40、0.20 和 0.15nmol/L。实际全血样中的平均回收率分别是原卟啉 $(86.5\pm 4.2)\%$ ,尿卟啉 $(89.6\pm 2.3)\%$ 和粪卟啉 $(89.8\pm 3.9)\%$ 。

第四章建立了一种同时测定超微量血细胞中原卟啉、粪卟啉和锌原卟啉的导数恒基体—非线性可变角同步荧光法。该法一次光谱扫描就能同时分辨出光谱严重重叠原卟啉、粪卟啉和锌原卟啉,并且三者的检测限依次为:0.58、0.21 和 0.05nmol/L。实际血细胞中的平均回收率分别是原卟啉 $(82.5\pm 9.1)\%$ ,粪



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库